

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/70681 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07C 335/20,
C07H 21/00, C12Q 1/68, G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03295

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. März 2001 (22.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 13 993.0 22. März 2000 (22.03.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): CHIMERA BIOTEC GMBH [DE/DE]; Schwach-
hauser Heerstrasse 30A, 28209 Bremen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BENTERS, Rüdiger [DE/DE]; Brückstrasse 9, 26452 Sande (DE).
NIEMEYER, Christof [DE/DE]; Tettenbornstrasse 4,
28211 Bremen (DE). WÖHRLE, Dieter [DE/DE]; Sche-
lenkampsweg 12, 28359 Bremen (DE).

(74) Anwalt: STILKENBÖHMER, Uwe; Eisenführ, Speiser
& Partner, Martinistrasse 24, 28195 Bremen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ARTICLES HAVING AN ACTIVATED SURFACE FOR IMMOBILIZING MACROMOLECULES AND METHOD
FOR PRODUCING SUCH ARTICLES

(54) Bezeichnung: ARTIKEL MIT AKTIVIERTER OBERFLÄCHE ZUR IMMOBILISIERUNG VON MAKROMOLEKÜLEN
UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG SOLCHER ARTIKEL

(57) Abstract: The invention relates to articles having an activated surface for immobilizing bioorganic macromolecules. Said articles comprise: a substrate with a surface; a dendritic skeleton linked to the substrate surface, and; a number of first coupling groups linked to the dendritic skeleton for immobilizing bioorganic macromolecules. The articles can be produced using a method comprising the following steps: providing a substrate with a surface; linking the substrate surface to a dendritic skeleton, and; furnishing the dendritic skeleton with a number of first coupling groups for immobilizing bioorganic macromolecules.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Artikel mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle, umfassend ein Substrat mit einer Oberfläche, ein mit der Substrat-Oberfläche verknüpftes dendriteres Gerüst und eine Anzahl von mit dem dendriteren Gerüst verknüpften ersten Kupplungsgruppen zur Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle. Die Artikel lassen sich durch ein Verfahren mit folgenden Schritten herstellen: Bereitstellen eines Substrates mit einer Oberfläche. Verknüpfen der Substrat-Oberfläche mit einem dendriteren Gerüst und; Ausrüsten des dendriteren Gerüsts mit einer Anzahl von ersten Kupplungsgruppen zur Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle.

WO 01/70681 A1

BEST AVAILABLE COPY

Artikel mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung von Makromolekülen
und Verfahren zur Herstellung solcher Artikel

Die vorliegende Erfindung betrifft Artikel, insbesondere Sensoren, mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle sowie Verfahren zu deren Herstellung. Die erfindungsgemäßen Verfahren umfassen insbesondere Verfahren zur Erzeugung von aktivierten Sensoroberflächen zur hocheffizienten kovalenten Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle.

Der Nachweis von beispielsweise bioorganischen Makromolekülen über Affinitätsreaktionen an Biosensoren erfordert Substrat-Oberflächen, die mit einem Reaktionspartner der wechselwirkenden Biomoleküle beschichtet sind (Festphasen-Methode). Um diesen Reaktionspartner dauerhaft auf einer Sensormatrix (als Beispiel einer Substratoberfläche) fixieren zu können, ist diese zuvor chemisch so zu modifizieren, dass reaktive Kupplungsgruppen zur

Immobilisierung bereitgestellt werden. Bei diesen Kupplungsgruppen handelt es sich typischerweise um reaktive Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Acylhalogenid-, Aldehyd-, Isothiocyanat- oder Epoxygruppen, die über Spacer kovalent mit der Oberfläche verknüpft sind. Besonders attraktiv, weil kostenminimierend ist es, wenn der Sensor regenerierbar und damit mehrfach verwendbar ist. Deshalb sollte die Immobilisierungsmethode so konzipiert werden, dass die Fixierung der Makromoleküle auf der Oberfläche über kovalente, oxidationsstabile Linkersysteme erfolgt.

Frühere Strategien zur Immobilisierung gehen von linearen Linkern aus. So lassen sich beispielsweise Siliciumdioxid-Oberflächen durch Beschichtung mit einem N-Alkylamino-Silan für die Kupplung bioorganischer Makromoleküle aktivieren (Chrissey, L.; O'Ferrall, C.E.; Spargo, B.J.; Dulcey, C.S.; Calvert, J.M. *Nucleic Acids Research* **24/15** 3040-3047 (1996)). Eine andere Möglichkeit besteht darin, Gold-beschichtete Oberflächen einzusetzen, indem die Kupplung der Makromoleküle über eine -funktionalisierte Alkylthiol-SAM (SAM=self-assambled-monolayer) (Bardea, A.; Dagan, A.; Willner, I. *Anal. Chim. Acta* **385**, 33-43 (1998)) erfolgt. Enthält das zu immobilisierende Makromolekül Thiol-Gruppen, ist die direkte Kupplung durch Chemisorption an die Goldoberfläche möglich, vgl. DE 19807339 A1. Glasoberflächen lassen sich durch den Einsatz geeigneter Silane funktionalisieren. Zur Immobilisierung von hydroxyl- oder aminofunktionalisierten Biomolekülen werden häufig mit Epoxyalkylsilan aktivierte Glasoberflächen eingesetzt (vgl. US-Patent 5,919,626), während thiolierte Makromoleküle über Disulfidbrücken an Thiolsilan-aktivierte Oberflächen gekuppelt werden können (vgl. US-Patent 5,837,860). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Avidin / Streptavidin beschichteten Oberflächen, die sich als hochaffin gegenüber biotinylierten Substanzen erweisen (vgl. DE 3640412 A1; DE 19724787 A1).

Die aufgeführten Verfahren sind jedoch optimierungsbedürftig, da sie im allgemeinen nur zu einer geringen Belegungsdichte und einer mangelnden Regenerierbarkeit der so hergestellten Oberflächen führen. Beispielsweise wird die Au-Schwefel-Bindung in Gegenwart von Sauerstoff oxidativ zerstört, Avidin/Streptavidin-Oberflächen werden bei thermischer Regeneration denaturiert und silylierte Glas-Oberflächen sind instabil gegenüber alkalischen Medien mit

einem pH > 8 (vgl. Sandoval, J.E. et al., Anal. Chem. 63, 2634-2641 (1991)). Die durch Silylierung erhaltenen Glas-Oberflächen weisen zudem nur eine geringe Beladungsdichte auf, was häufig zu einer ungenügenden Sensitivität der Sensoren führt (vgl. Southern et al. *Nature genetics supplement* 21, 5-9 (1999)).

Inzwischen gibt es mehrere Arbeiten mit dem Ziel, die Beladungsdichte und Regenerierbarkeit der Oberflächen zu verbessern, z. B. durch den Einsatz von kovalent (vgl. Löfas, S. et al. *Pure Appl. Chem.* 67, 829-834 (1995)) oder chemisorptiv auf Gold (vgl. Johnsson, B.; Löfas, S.; Lindquist, G. Anal. Biochem. 198, 268-277 (1991)) gebundenen Dextran-Zwischenschichten mit Hydrogeleigenschaften. Die Immobilisierung an diesen Oberflächen erfolgt jedoch statistisch innerhalb der Hydrogelmatrix, was sich nachteilig auf die Zugänglichkeit der immobilisierten Komponente auswirkt, da die heterogene Interphasen-Reaktion durch Diffusionsprozesse limitiert wird (vgl. Southern et al. *Nature genetics supplement* 21, 5-9 (1999)). Dieses Problem tritt auch bei dem Ansatz auf, oberflächenaktivierte Mikropartikel (CPG, Magnetic Beads, Merrifield Harz, etc.) auf den Sensoroberflächen kovalent zu binden, um hierdurch eine Oberflächen-Vergrößerung zu erreichen (vgl. US-Patent 5,900,481). Die so präparierten Oberflächen sind mikroporös und erweisen sich bei Affinitätsreaktionen aufgrund limitierter Diffusion als problematisch.

Von Beier et al. wird ein Verfahren beschrieben, mit dem es gelingt, die Anzahl potentieller Bindungsstellen für Makromoleküle auf der Sensoroberfläche durch den in-situ-Aufbau verzweigter Linkersysteme zu erhöhen (vgl. Beier, M.; Hoheisel, J.D. Vol27/No9, 1970-1977 (1999)). Allerdings ist hierzu, nach vorhergehender Aminierung des Supports (Substrats) (Silylierung, RFPE = Radiofrequenzplasmaentladung in Ammoniak, etc.), die sukzessive Wiederholung einer ca. 1-2 Tage dauernden, 2-stufigen Synthese, gefolgt von einer abschließenden Endgruppenaktivierung, notwendig. Typischerweise sind so 8 und mehr Reaktionsschritte an mehreren Tagen erforderlich, um die aktivierten Oberflächen herzustellen.

Angesichts der bestehenden Nachteile der bekannten Verfahren war eine erste (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung eines Artikels, insbesondere Sensors, mit einer aktivierten Oberfläche, die über eine hohe Dichte

an reaktiven Kupplungsgruppen verfügt und zudem eine hohe physikalisch-chemische Stabilität gegenüber thermischen und chemischen Regenerationsschritten aufweist.

In verfahrensmäßiger Hinsicht war es eine zweite (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Methode anzugeben, die es erlaubt, in wenigen Reaktionsschritten eine derartige aktivierte Oberfläche aufzubauen.

Eine dritte (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Angabe eines entsprechenden Verfahrens zur Herstellung eines Artikels (insbesondere Sensors) mit einem auf der Oberfläche immobilisierten bioorganischen Makromolekül.

Die erste (Teil-)Aufgabe wird gelöst durch einen Artikel mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle, umfassend

- ein Substrat mit einer Oberfläche,
- ein mit der Substrat-Oberfläche verknüpftes dendrimeres Gerüst und
- eine Anzahl von mit dem dendrimeren Gerüst verknüpften ersten Kupplungsgruppen (also z.B. NHS oder Isothiocyanatgruppen) zur Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle.

Bei dem Artikel kann es sich insbesondere um einen (Bio-)Sensor oder Sensorelement, wie beispielsweise ein DNA-Mikroarray, ein Protein-Array aus Antikörpern-, Rezeptoren- und/oder Enzymen, ein Testarray aus Peptiden, Peptiden, oder niedermolekularen Verbindungen wie Pharmakophore oder andere Wirkstoffe handeln.

Das dendrimere Gerüst kann den Anforderungen des Einzelfalls entsprechend eine Vielzahl von identischen oder unterschiedlichen ersten Kupplungsgruppen (also z.B. NHS-Ester, Isothiocyanatgruppen, Nucleinsäurestränge o.dgl.) umfassen. So sollen Sensoren häufig in der Lage sein unterschiedlichste Analyten nachzuweisen, und es ist dann sinnvoll, diesen unterschiedlichen Analyten unterschiedliche erste Kupplungsgruppen anzubieten.

Vorteilhafterweise ist die Substrat-Oberfläche mit dem dendrimeren Gerüst über eine Verknüpfungseinheit verknüpft, die (bei der Herstellung des Artikels, siehe

dazu unten) durch Umsetzung einer der Substrat-Oberfläche zugeordneten Initiator-Gruppe mit einer dem dendrimeren Gerüst zugeordneten komplementären funktionellen Gruppe gebildet werden kann. War ursprünglich beispielsweise der Oberfläche eine Initiatorgruppe mit einer freien Carboxy-Funktion zugeordnet und war die komplementäre Gruppe des dendrimeren Gerüsts eine Aminofunktion, so handelt es sich bei der Verknüpfungseinheit um ein Amid. Weitere Beispiele für Initiatorgruppen und komplementäre funktionelle Gruppen werden weiter unten im Zusammenhang mit der Erläuterung der erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren angegeben. Dem Fachmann ist in Kenntnis der Edukt-Gruppen klar, wie die (Produkt-)Verknüpfungseinheit aufgebaut ist.

Das dendrimere Gerüst kann insbesondere folgende dendrimere Grundeinheiten umfassen, die im dendrimeren Gerüst miteinander vernetzt sein können: Starburst-Dendrimere und deren insbesondere chemisch oder biochemisch modifizierte Derivate, Metallodendrimere, Carbosilan-Dendrimere, Polysilan-Dendrimere, Glycosyl-haltige Dendrimere, Saccharid- und Oligosaccharid-Dendrimere und deren Derivate, Peptid- und Oligopeptid-Dendrimere und deren Derivate sowie Nucleotid- und Oligonucleotid-Dendrimere und deren Derivate.

Vorteilhafterweise trägt das dendrimere Gerüst erste Kupplungsgruppen zur Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle oder sonstiger Substanzen, die (bei der Herstellung des Artikels, siehe dazu unten) durch Umsetzung einer dem dendrimeren Gerüst zugeordneten funktionellen Gruppe mit einer homo- oder heterobifunktionellen Linkersubstanz (Linkermolekül) gebildet werden können. Handelt es sich bei der dem dendrimeren Gerüst zugeordneten funktionellen Gruppe beispielsweise um eine Aminofunktion und handelt es sich bei der Linkersubstanz um die homobifunktionelle Substanz Phenylen-1,4-diisothiocyanat, so trägt das dendrimere Gerüst als erste Kupplungsgruppe eine Isothiocyanatgruppe. Weitere Beispiele für Linkersubstanzen werden weiter unten im Zusammenhang mit der Erläuterung der erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren angegeben. Dem Fachmann ist in Kenntnis der Edukt-Gruppen klar, wie die erste (Produkt-)Kupplungsgruppe, die bei Einsatz bifunktionaler Linkermoleküle monofunktionell ist, aufgebaut ist.

Vorteilhafterweise umfasst das dendrimere Gerüst mit der Substrat-Oberfläche verknüpfte dendrimere Grundeinheiten, die untereinander vernetzt sind, beispielsweise mit Hilfe bifunktioneller Linkersubstanzen (Linkermoleküle). Zu den hieraus resultierenden Vorteilen siehe unten.

Die zweite (Teil-)Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Artikels mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen eines Substrates mit einer Oberfläche
- Verknüpfen der Substrat-Oberfläche mit dendrimeren Grundeinheiten (insbesondere den Grundeinheiten eines dendrimeren Gerüsts) und
- Ausrüsten des dendrimeren Gerüsts mit einer Anzahl von ersten Kupplungsgruppen zur Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle.

Der hergestellte Artikel ist dann in der Regel ein Artikel, wie er zuvor näher beschrieben wurde.

Die Substrat-Oberfläche wird üblicherweise zunächst mit einer reaktiven Initiator-Gruppe modifiziert, dh. die Initiatorgruppe wird mit einer (unmodifizierten) Substrat-Oberfläche verbunden, bevor dann in einem Folgeschritt die (modifizierte) Substrat-Oberfläche mit dem dendrimeren Gerüst verknüpft (und somit weiter modifiziert) wird. Die Modifikation der Substrat-Oberfläche kann unter Einsatz von Standardmethoden erfolgen, vgl. Fig. 6.

Die reaktive, oberflächengebundene Initiator-Gruppe kann dabei ausgewählt sein aus einer der folgenden chemisch reaktiven Gruppen: Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Acylhalogenid-, Ester-, Aldehyd-, Epoxy- oder Thiolgruppe. Sie kann auch ausgewählt sein aus einer der folgenden biologisch oder chemisch reaktiven Gruppen: Disulfide, Metallchelat, Nucleotide- und Oligonucleotide, Peptide oder Haptene, wie beispielsweise Biotin-, Digoxigenin-, Dinitrophenylgruppen oder ähnliche Gruppen.

Die (unmodifizierte) Substrat-Oberfläche, an die die reaktive Initiator-Gruppe gekuppelt wird, wird vorzugsweise ausgewählt sein aus der folgenden Gruppe, die

besteht aus: Trägermaterialien auf der Basis von Metallen, Halbmetallen, Halbleitermaterialien, Metall- und Nichtmetalloxiden; Gläser; Kunststoffe; organische und anorganische Polymere; organische und anorganische Filme und Gele, insbesondere als Beschichtung eines der vorgenannten Materialien.

Das dendrimere Gerüst, welches üblicherweise über die reaktive Initiator-Gruppe einer modifizierten Substrat-Oberfläche mit dieser verknüpft wird, kann mehrere gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen pro dendrimere Grundeinheit umfassen. Bevorzugt handelt es sich hierbei um Aminoalkyl-, Hydroxyalkyl- oder Carboxyalkyl-Gruppen, die in der Peripherie der dendrimeren Grundeinheit gebunden sind und mit Hilfe der Linkersubstanz in die erste Kupplungsgruppe überführbar sind.

Die dendrimere Grundeinheiten können vorzugsweise ausgewählt sein aus der folgenden Gruppe, die besteht aus: Starburst-Dendrimere und deren chemisch und biochemisch modifizierte Derivate, Metallodendrimere, Glycosyl-haltige Dendrimere, Saccharid- und Oligosaccharid-Dendrimere und deren Derivate, Peptid- und Oligopeptid-Dendrimere und deren Derivate sowie Nucleotid- und Oligonucleotid-Dendrimere und deren Derivate.

Die Dendrimere, denen im fertigen erfindungsgemäßen Artikel die dendrimere Grundeinheiten entsprechen, werden in der Regel vor Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf übliche Weise synthetisiert (Zeng, F.; Zimmerman, S.C.; *Chem. Rev.* **97**, 1681-1712 (1997)) und zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellt.

Es kann sich um Dendrimere handeln, die

- (a) in-situ durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen durch einen parallelen Prozess, beispielsweise durch die Selbstorganisation auf der Basis von Wasserstoffbrücken-Bindung, Van-der-Waals-, Coulomb- oder Metall-Ligand Wechselwirkung, oder
- (b) in-situ durch einen sukzessiven Prozess über kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen wie beispielsweise der Selbstorganisation durch Wasserstoffbrücken-Bindung, Coulomb-Wechselwirkung oder der Metall-Ligand Wechselwirkung aufgebaut werden.

Vorteilhafterweise werden die dendrimeren Grundeinheiten (d.h. die Edukt-Dendrimere oder das daraus gebildete dendrimere Gerüst) mit einer Anzahl von Kupplungsgruppen zur Immobilisierung insbesondere bioorganischer Makromoleküle ausgestattet, indem der dendrimeren Grundeinheit zugeordnete funktionelle Gruppen mit einer homo- oder heterobifunktionellen Linkersubstanz (Linkermolekül) umgesetzt werden.

Die dendrimeren Grundeinheiten können vor oder nach dem Verknüpfen der Substrat-Oberfläche mit den dendrimeren Grundeinheiten mit den ersten Kupplungsgruppen ausgerüstet werden.

Als homobifunktionelle Linkersubstanzen können insbesondere eingesetzt werden:

photochemisch, chemisch, biochemisch oder biologisch aktive Verbindungen wie beispielweise Dicarbonsäuren und deren Anhydride, Disuccinimidylglutarat, Phenylendiisothiocyanate, *Bis*-[β -(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide, 1,4-*Bis*-Maleimidoalkane, 1,6-Hexan-*bis*-vinylsulfon.

Als heterobifunktionelle Linkersubstanzen können insbesondere eingesetzt werden:

photochemisch, chemisch, biochemisch oder biologisch aktive Verbindungen wie beispielweise 3-[(2-Aminoethyl)dithio]propionsäure, *N*- α -Maleimidoacetoxy)succinimid, 4-[*p*-Azidosalicylamido]butylamin, *N*-[(β -Malimido-propoyloxy)succinimid, *N*-[κ -Malimidoundecansäure]hydrazid, Succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamido]hexanoat, *N*-Succinimidyl-iodoacetat.

In Kenntnis der den dendrimeren Grundeinheiten zugeordneten funktionellen Gruppen und der einzusetzenden bifunktionellen Linkersubstanzen kann der Fachmann präzise vorhersagen, welche Funktionalitäten das dendrimere Gerüst des fertigen Artikels trägt.

Im Hinblick auf eine hohe physikalisch-chemische Stabilität besonders bevorzugt ist eine Verfahrensgestaltung (und sind es dementsprechend die dann resultierenden Artikel), bei der die Oberflächen-gebundenen dendrimeren Grundeinheiten mit Hilfe homobifunktionaler Linkersubstanzen, ausgenommen Carbonsäureanhydride, quervernetzt werden, so dass ein polymerer Dünnsfilm aus

dendrimeren Grundeinheiten entsteht. Die Linkersubstanzen sind dabei vorzugsweise aber nicht notwendigerweise die gleichen, die zur Erzeugung der Kupplungsgruppen eingesetzt werden; auf die obigen Ausführungen zu bevorzugten Linkersubstanzen wird verwiesen.

Im Hinblick auf eine hohe Immobilisierungskapazität besonders bevorzugt ist hingegen eine Verfahrensgestaltung (und sind es dementsprechend die dann resultierenden Artikel), bei der die erste Kupplungsgruppe mit Hilfe heterobifunktionaler Linkersubstanzen oder mit Carbonsäureanhydriden erzeugt wird. Bei dieser Verfahrensgestaltung wird jede funktionelle Gruppe der dendrimeren Grundeinheit in eine aktive Kupplungsgruppe umgewandelt; auf die obigen Ausführungen zu bevorzugten Linkersubstanzen wird verwiesen.

Die Auswahl von Dendrimeren (dendrimeren Grundeinheiten) und Linkersubstanzen wird der Fachmann dementsprechend insbesondere mit Blick auf die zu immobilisierenden Substanzen und mit Blick auf eine gute Vernetzung der dendrimeren Grundeinheiten vornehmen.

Gemäss der bevorzugten Verfahrensgestaltung wird aus den oberflächenfixierten Dendrimeren durch kovalente Vernetzung eine makromolekulare Oberfläche aufgebaut. Die so generierten Oberflächen weisen im Vergleich zu gängigen linearen Linkersystemen zwei entscheidende Vorteile auf. Durch die (kovalente) Quervernetzung der immobilisierten Dendrimere besitzen die Oberflächen eine erhöhte physikalisch-chemische Stabilität und ermöglichen damit die verlustfreie Regenerierbarkeit der mit bioorganischen Makromolekülen beladenen Oberflächen (beispielsweise Sensor-Oberflächen). Des weiteren wird durch die Verwendung polyfunktionalisierter Dendrimere die Immobilisierungseffizienz drastisch erhöht. In Kombination mit der in der chemischen Natur der Dendrimere begründeten hohen Flexibilität des Linkersystems ergibt sich eine hohe Sensitivität bei heterogenen Affinitätsreaktionen, wie beispielsweise der Hybridisierung von Nucleinsäuren und von Antikörper-Antigen, von Protein-Protein-, von Protein-Ligand- oder von Rezeptor-Substrat Wechselwirkungen.

Besonders bevorzugt ist eine Verfahrensgestaltung, bei der der Aufbau des dendrimeren Gerüsts und somit ein wesentlicher Schritt bei der Herstellung erfindungsgemäßer Artikel, z.B. der Aufbau von Aminodendrimer-

Sensoroberflächen, über eine Sandwich-Präparation erfolgt. Wie in Fig. 5 schematisch gezeigt, werden hierbei jeweils zwei z.B. durch Aminosilylierung und anschließende Aktivierung mittels z.B. Disuccinimidylglutarat aktivierte Substrate, beispielsweise zwei Glas-Objektträger einer Fläche von ca. 3 x 8 cm (beliebige andere Größen sind ebenfalls einsetzbar), paarweise so zusammengesetzt, dass die Immobilisierung des Dendrimers im Zwischenraum zwischen den zwei Substraten (z.B. Glasträgern) erfolgen kann. Bei Verwendung von Glas-Objektträgern werden hierzu typischerweise etwa 100 Mikroliter einer 10%igen Lösung des (Amino-)Dendrimers auf die Oberfläche eines der zwei Objektträger aufgetragen, und anschließend durch Auflegen des zweiten Objektträgers der Tropfen der (Amino-)Dendrimer-Lösung gespreitet, so dass sich ein dünner Film der (Amino-)Dendrimer-Lösung zwischen den zwei Substraten ausbildet. Von besonderem Vorteil bei diesem Vorgehen ist einerseits, dass durch den aufgetragenen Dünnsfilm die Reaktionsgeschwindigkeit und Homogenität der Oberflächenreaktion verbessert werden, und andererseits, dass nur geringe Mengen der teuren Reagenzienlösungen benötigt werden. Die Sandwich-Präparation kann ebenfalls zur Erzeugung der ersten Kupplungsgruppe angewendet werden, indem eine gesättigte Lösung der Linkersubstanz, z.B. Glutarsäureanhydrid oder 1,4-Phenylendiisothiocyanat auf die, mit dendrimeren Einheiten beschichteten Substrate aufgebracht wird.

Eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, zunächst große planare Substrate, deren Fläche beispielsweise einem Vielfachen einer angestrebten Chip-Oberfläche entspricht, mit Hilfe der oben beschriebenen Schritte mit Dendrimer-Schichten zu modifizieren. Typischerweise wird hierbei so vorgegangen, dass auf beispielsweise etwa 100 cm x 100 cm großen Glasscheiben (oder entsprechenden Scheiben anderer Substrate; einsetzbar sind auch wesentlich größere Scheiben) zunächst durch bekannte physikalische, mechanische oder chemische Verfahren ein Raster der herzustellenden Chipformate aufgebracht wird, indem Bruchkanten erzeugt werden, an denen die Glasscheibe (oder das sonstige Substrat) später in das endgültige Chipformat zerteilt werden kann. Anschließend erfolgt üblicherweise die chemische Modifizierung indem die oben (und in den Beispielen weiter unten) beschriebenen Schritte, also z.B. Reinigungs-, Silylierungs- und Aktivierungsschritte, beispielsweise in Tauchbädern durchgeführt werden. Die

Auftragung des Dendrimers erfolgt vorteilhafterweise nach der oben genannten Sandwich-Technik, und die endgültige Aktivierung der Dendrimere mittels homo- oder heterobifunktioneller Linker erfolgt bevorzugt in Sandwich- oder durch Tauchbehandlung. Anschließend erfolgt die Zertrennung der großflächigen Substratscheiben in das entgültige Format. Alternativ können die großflächig Dendrimer-beschichteten Scheiben zunächst zerteilt und erst anschließend, je nach Bedarf, mittels bifunktioneller Linker aktiviert werden.

Der Vorteil dieser Verfahrensgestaltung (inklusive der genannten Alternativen) besteht darin, dass hierdurch eine Maßstabsvergrößerung bei der Herstellung von Chips erreicht wird, so dass große Stückzahlen der aktivierten Chip-Oberflächen mit der vorteilhaften Sandwich-Technik hergestellt werden können.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, auf einer Substrat-Oberfläche ein vernetztes dendrimeres Gerüst mit freien Kupplungsgruppen als makromolekulare (Zwischen-)Schicht anzubringen (vgl. Fig. 1), wodurch (a) die Anzahl potentieller Bindungsstellen für die Immobilisierung von bioorganischen Makromolekülen oder sonstigen Substanzen erhöht, (b) die physikalisch-chemische Stabilität der Oberfläche verbessert und (c) die Regenerierbarkeit der mit den bioorganischen Makromolekülen modifizierten Substrat-Oberflächen (Träger) verbessert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Artikel, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren (inklusive der oben angegebenen besonderen Verfahrensgestaltungen) erhältlich sind.

Die erfindungsgemäßen Artikel umfassen funktionalisierte Festphasen und können beispielsweise als Sensorelemente, Reaktorelemente und Elemente mit elektrischen, elektronischen oder optischen Funktionen eingesetzt werden. So lassen sich die mit bioorganischen Molekülen-funktionalisierten Artikel neben den oben bereits genannten Biosensoren (DNA- und Protein-Arrays) auch vorteilhaft als Festphasen in Enzym-Reaktoren einsetzen, in denen eine hohe physikalisch-chemische Widerstandsfähigkeit und hohe Belegungsdichten benötigt werden. Wegen der Möglichkeit, DNA-Mikroarrays hoher Integrationsdichte mit anorganischen Kolloiden und Halbleiter-Nanokristallen zu funktionalisieren (vgl. hierzu Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 609 (2000)) lassen sich die

widerstandsfähigen Oberflächen auch vorteilhaft zum Aufbau elektronisch- und optisch-aktiver Elemente, beispielsweise für hochauflösende Displays, einsetzen.

Die dritte (Teil-)Aufgabe schließlich wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Artikels mit einem auf der Oberfläche immobilisierten (Makro- oder sonstigen) Molekül mit folgendem Schritt:

- Kontaktierung eines mindestens eine zweite Kupplungsgruppe umfassenden Makromoleküls
 - (a) mit einem erfindungsgemäßen Artikel oder
 - (b) mit einem nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Artikel mit aktivierter Oberfläche
- unter Bedingungen, bei denen zumindest eine erste Kupplungsgruppe des Artikels und eine zweite Kupplungsgruppe des Makromoleküls unter Ausbildung einer Verknüpfung zwischen Makromolekül und Artikel miteinander reagieren.

Neben bioorganischen Makromolekülen lassen sich auch andere Substanzen wie makromolekulare Kolloide und Nanopartikel oder niedermolekulare Verbindungen wie pharmakologische Substanzen, Hormone, Antigene oder andere Wirkstoffe auf entsprechend präparierten erfindungsgemäßen Artikeln (a oder b) immobilisieren.

Die Erfindung betrifft auch Artikel, die ein mit dem dendrimeren Gerüst verknüpft (Makro- oder sonstiges) Molekül umfassen. Das (Makro-)Molekül kann dabei beispielsweise eines sein, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: Antikörpern, insbesondere der Klassen IgG, IgM, IgA, Enzymen; Rezeptoren; Membranproteinen, Glykolproteinen; Kohlenhydraten; Nucleinsäuren; wie z.B. DNA, RNA, Peptid Nucleinsäure (PNA), Pyranosyl-Ribonucleinsäure (pRNA).

Unter den Begriff „andere Substanzen“ fallen insbesondere organisch-chemische oder anorganisch-chemische Gruppen mit spezifischen oder auch potentiell wirksamen pharmakologischen, katalytischen (z.B. photokatalytisch aktive Substanzen wie Porphyrine und ihre Derivate oder Katalysatoren für die stereoselektive Umformung organischer oder anorganischer Substrate), optischen oder elektrischen Eigenschaften (z.B. fluoreszente, elektrolumineszente oder elektrisch-leitfähige Polymere (Polyanilin, Polypyrrol) Verbindungen. Auch können

Substanzbibliotheken, die beispielsweise durch kombinatorische Festphasensynthese zugänglich sind, auf dem Artikel immobilisiert werden, um die Funktionalität dieser gebundenen Substanzen, z.B. deren Inhibitorwirkung auf biologische Enzyme oder Rezeptoren, zu screenen.

Grundlage der vorliegenden Erfindung ist unter anderem die überraschende Beobachtung, dass Nucleinsäure-funktionalisierte Glasoberflächen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wurden, nicht nur eine drastisch verbesserte Nachweisgrenze bei der Detektion komplementärer Nucleinsäuren aufweisen, sondern darüber hinaus auch eine deutlich gesteigerte physikalisch-chemische Stabilität zeigen, so dass die Regenerierbarkeit der Nucleinsäure-modifizierten Träger durch Behandlung mit alkalischen Waschlösungen viele Male ohne Aktivitätsverlust der Oberfläche durchgeführt werden konnte. Es wurde festgestellt, dass die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Artikel eine signifikant verbesserte physikalisch-chemische Stabilität aufweisen und damit die verlustfreie Regenerierbarkeit der mit den bioorganischen Makromolekülen modifizierten Trägern möglich wird. Darüber hinaus bewirkt die chemische Natur der dendrimeren Grundeinheiten, dass das Linkersystem für die Anknüpfung der bioorganischen Makromoleküle hochgradig flexibel ist, wodurch zusätzliche Vorteile gegenüber linearen Linkersystemen hinsichtlich der Effizienz der heterogenen Affinitätsreaktion resultieren.

Wie bereits erwähnt, ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, auf einer Substrat-Oberfläche ein vernetztes dendrimeres Gerüst mit freien Kupplungsgruppen als makromolekulare (Zwischen-)Schicht anzubringen (vgl. Fig. 1). Die Anbringung der makromolekularen Schicht wird beispielsweise erreicht, indem eine durch Standardverfahren hergestellte, z.B. Amino-, Epoxy- oder Carboxyl-modifizierte Glasoberfläche (als Substratoberfläche) zunächst mit einem dendrimeren Makromolekül und anschließend mit einem homo- oder heterobifunktionalen Linkerreagenz behandelt wird. Durch die Anbindung der dendrimeren Komponente an die modifizierte Glasoberfläche wird die Anzahl der Bindungsstellen für die Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle (z.B. bestimmter Nucleinsäuren) erhöht. Durch die Behandlung mit dem homobifunktionalen Linkerreagenz werden vorzugsweise (a) die mit der Substrat-Oberfläche verknüpften Dendrimer-Einheiten für die Immobilisierung der

bioorganischen Makromoleküle aktiviert, d.h. mit freien Kupplungsgruppen ausgerüstet und (b) die Dendrimer-Einheiten kovalent vernetzt. Bioorganische Makromoleküle lassen sich sehr stabil auf der Oberfläche eines so hergestellten Artikels immobilisieren.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren näher erläutert.

Beispiele

Beispiel 1:

Verfahren zur Herstellung eines Glasträgers mit einem auf der Glasträgeroberfläche angebrachten, gecrosslinktem Dendrimergerüst mit freien Isothiocyanat-Kupplungsgruppen, sowie Immobilisierung eines bioorganischen Makromoleküls durch Ankopplung an die Kupplungsgruppen

1.1 Aminosilylierung einer Glasoberfläche (Oberflächenaktivierung):

Es wurde ein Glasträger mit einer Oberfläche auf der Basis von Siliziumdioxid bereitgestellt. Die Glasoberfläche wurde gründlich gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Ultraschall} \rightarrow \text{Bidest}$). Danach wurde die Glasoberfläche silyliert (vgl. Fig. 1; Schritt 1), und zwar mit 3-Aminopropyltriethoxysilan in Ethanol / Wasser (95:5) mit einem in der Literatur beschriebenen Verfahren (Maskos, U.; Southern E.M.; *Nucleic Acids Res.*, **20(7)**, 1679-1684 (1992) (andere Silylierungsverfahren sind ebenfalls anwendbar).

1.2 Carboxyfunktionalisierung der Oberfläche

Die gemäß 1.1 hergestellte aminosilylierte Glasoberfläche wurde mit einer 10 mM Lösung aus Disuccinimidylglutarat in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -Ethyl-diisopropylamin (100:1) für 2h bei RT unter Argon carboxyfunktionalisiert (vgl. Fig.1, Schritt 2). Die Oberfläche wurde anschließend mehrfach gründlich mit CH_2Cl_2 gewaschen.

Die auf diese Weise eingeführte Carboxygruppe konnte anschließend als Initiatorgruppe eingesetzt werden

1.3 Verknüpfung der Oberfläche mit einem aminoterminierten Dendrimer (Amino-Dendrimer-Immobilisierung)

Die Oberfläche wurde mit einer 10%igen Lösung eines unter dem Handelsnamen Starburst (PAMAM) gehandelten Aminodendrimers (Fa. Aldrich Chem. Co, vgl. auch Yamakawa, Y et al. *J. of Polymer Science: Part A* **37** 3638-3645 (1999)) in Methanol benetzt (vgl. Fig.1, Schritt 3). Dieser Schritt kann beispielsweise mit dem bereits beschriebenen, vorteilhaften Sandwich-Verfahren durchgeführt werden. Nach 30minütiger Reaktionszeit (Umsetzung der Carboxygruppen mit den Aminogruppen des Dendrimers) wurde der Überschuss an Dendrimer durch Waschen entfernt und die nun mit Dendrimer versehene (Glasträger-)Oberfläche im Stickstoffstrom getrocknet.

1.4 Umsetzen mit Linkersubstanz (Erzeugen von freien Kupplungsgruppen und Vernetzen der Dendrimer-Einheiten)

Die gemäss 1.3 mit Dendrimer ausgerüsteten Glasträger wurden in eine 20 mM Lösung eines homobifunktionalen Linkermoleküls, beispielsweise Phenylen-1,4-diisothiocyanat, in CH_2Cl_2 /Pyridin (100:1) überführt (vgl. Fig.1, Schritt 4). Nach 30minütiger Reaktionszeit wurde gründlich mit CH_2Cl_2 gewaschen. Der Glasträger mit Dendrimer-Oberfläche konnte jetzt direkt für eine im folgenden näher beschriebene Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle eingesetzt oder alternativ bis zur Verwendung unter Argon aufbewahrt werden.

1.5 Anknüpfung (Immobilisierung) bioorganischer Makromoleküle - allgemeine Verfahrensvorschrift:

Die gemäss 1.4 vorbereitete Oberfläche wurde mit Tropfen einer wässrigen Lösung benetzt, die ein zu immobilisierendes bioorganisches Makromolekül in einem typischen Konzentrationsbereich von 1 - 100 μM enthielt. Bei der bioorganischen Komponente handelte es sich beispielsweise um 5'-Amino-

modifizierte Oligonucleotide, wie sie von einer Vielzahl kommerzieller Lieferanten bezogen werden können.

Die benetzten Oberflächen wurden in einer Feuchtigkeitskammer mehrere Stunden inkubiert. Die optimale Inkubationszeit war dabei abhängig von Art und Konzentration der zu immobilisierenden Komponente.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen bei gegebenenfalls vorgesehenen Affinitätsreaktionen wurden die während der Inkubationszeit nicht abreagierten Kupplungsgruppen anschließend deaktiviert. Hierzu wurde das Glasträger-Element zum Beispiel in eine 6-Aminohexanol-Lösung (100 mM in Dimethylformamid (DMF)) überführt, um noch aktive Isothiocyanatgruppen eines Phenylendiisothiocyanatlinkers (siehe 1.4 oben) zu inaktivieren. Die Glasträger-Oberfläche wurde daraufhin mit detergenzhaltigen Lösungen, beispielsweise Natriumdodecylsulfat, von nicht kovalent angebundenen bioorganischen Makromolekülen befreit, dann mehrmals in bidestilliertem Wasser gespült und im N₂-Strom getrocknet. Bis zur Verwendung wurden die beladenen Sensoren bei - 20 °C gelagert.

Dendrimer-basierte, Isothiocyanat-funktionalisierte Oberflächen, die beispielsweise mit amino-funktionalisierten Oligonucleotiden beladen sind, sind als Sensoroberflächen von besonderem Interesse für die DNA-Chiptechnologie, vgl. Niemeyer, C.M.; Blohm, D. *Angew. Chem.* **111/19** 3039-3043 (1999). Vgl. in diesem Zusammenhang auch Fig.2 und die zugehörigen Erläuterungen.

Beispiel 2:

1. Variation: Modifikation von Glasträger-Oberflächen unter Verwendung carboxyterminierter Dendrimere

Die Aminierung eines Trägers auf Glasbasis erfolgte wie in Beispiel 1 unter 1.1 beschrieben.

Zum Aufbau einer Carboxydendrimer-Oberfläche wurde zunächst ein carboxyterminiertes Dendrimer (Handelsname Starburst (PAMAM) Dendrimer; Aldrich Chem. Co) nach bekannten Methoden, beispielsweise wie von Johnsson, B.; Löfas, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* **198** 268-277 (1991) beschrieben, in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid verestert. Das aktivierte Dendrimer wurde in DMF auf die aminosilylierte Oberfläche gebracht und nach 30minütiger Reaktionszeit wurde das überschüssige Dendrimer mit DMF abgewaschen. Die Oberflächen konnten anschließend direkt, wie in Beispiel 1 beschrieben für die Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle eingesetzt werden. Alternativ konnten die aktivierten Oberflächen unter Argon gelagert werden.

Beispiel 3:

2. Variation: Aufbau makromolekularer Sensoroberflächen auf Basis aminoreaktiver Silanoberflächen

Die Reinigung der Glasoberflächen erfolgt wie unter Beispiel 1, 1.1 beschrieben. Im Falle hydrolysestabiler Silane wie 3-Carboxypropyltrialkoxysilan erfolgt die Silanisierung wie unter Beispiel 1, 1.1 angegeben. Sofern es sich um ein hydrolyseempfindliches Silane handelt, wie beispielsweise 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan, 2-(3,4-Epoxy-cyclohexyl)-ethyltriethoxysilan, 3-Iodopropyltrimethoxysilan, 3-Isothiocyanatotrialkoxysilan und den entsprechenden Trihalogensilanen wird die Silanisierung vorzugsweise unter trockenen Bedingungen wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Southern, E.M. et al.; *Nucleic Acids Res.*, **22(8)**, 1368-1373 (1994); andere Verfahren ist ebenfalls denkbar. Epoxy-, Isothiocyanato- und Iodo-terminierte Silanoberflächen werden direkt zur Anbindung des aminofunktionalisierten Dimer eingesetzt, während carboxyfunktionalisierte Silanoberflächen zunächst durch Umsetzung mit DCC/NHS, wie unter Beispiel 7, 7.2 beschrieben, aktiviert werden. Die weitere Umsetzung der Dendrimeroberfläche mit einem homo-, oder heterobifunktionalem Spacer zur Erzeugung der ersten Kupplungsgruppe und die Anknüpfung der Makromoleküle an diese erfolgt wie unter Beispiel 1, 1.4 – 1.5, sowie Beispiel 7, 7.4 beschrieben.

Beispiel 4:3. Variation: Verwendung von Kunststoffträgern

Oberflächen von Kunststoffträgern aus beispielsweise Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Polycarbonat, Polyacrylnitril oder deren Copolymere wurden nach bekannten Verfahren, beispielsweise nach der Methode von Hartwig, A. et al. *Advances in Colloid and Interface Science* **52**, 65-78 (1994) durch Radiofrequenz-Plasmaentladung in einer Ammoniak-Atmosphäre aminiert.

Der Aufbau Dendrimer-basierter Oberflächen erfolgte dann wie in Beispiel 1, 2 oder 7 beschrieben.

Beispiel 5:4. Variation: Verwendung von Gold-beschichteten Trägermaterialien

Gold-Schichten wurden auf übliche Weise auf diverse Träger aufgetragen und durch bekannte Verfahren aminiert, beispielsweise indem eine aminoterminierte SAM auf Gold hergestellt wird, wie dies von Glodde, M.; Hartwig, A.; Hennemann, O.-D.; Stohrer, W.-D. *Intern. J. of Adhesion & Adhesives* **18** 359-364 (1998) beschrieben wurde.

Der Aufbau Dendrimer-basierter Oberflächen und die Anbindung bioorganischer Makromoleküle erfolgte wie in den Beispielen 1-3 beschrieben.

Beispiel 6:5. Variation: Verwendung von Oberflächen auf der Basis von Silicium und anderen Metall und Halbleiter-Trägermaterialien

Metall- und Halbleiter-Oberflächen wurden mittels bekannter Verfahren aminiert beispielsweise durch Silylierung mit Amino-, Epoxy-, Carboxy- oder Thiolsilanen (vgl. Chrisey, L.; O'Ferrall, C.E.; Spargo, B.J.; Dulcey, C.S.; Calvert, J.M. *Nucleic Acids Research* **24/15** 3040-3047 (1996) und Bhatia, S.K. et al. *Anal. Biochem.*

178, 408-413 (1989)) oder durch Hydrosilylierung mit ω -Undecencarbonsäure (Sieval, A.B. et al.; *Langmuir* 14(7) 1759-1768 (1998)).

Die jeweiligen aktivierten Oberflächen wurden anschließend entsprechend den Beispielen 1-3 mit einer dendrimeren Komponente modifiziert.

Biorganische Makromoleküle wurden immobilisiert wie in Beispiel 1 unter 1.5 beschrieben.

Beispiel 7:

6.Variation: Verfahren zur Herstellung eines Glaträgers mit einem auf der Glaträgeroberfläche angebrachten, nicht vernetzten Dendrimergerüst mit freien NHS-Ester-Kupplungsgruppen

7.1 Aminosilylierung einer Glasoberfläche (Oberflächenaktivierung):

Die Silylierung erfolgte wie in Beispiel 1 unter 1.1 ausgeführt.

7.2 Carboxyfunktionalisierung der Oberfläche

Die gemäß 1.1 hergestellte aminosilylierte Glasoberfläche wurde mit einer gesättigten Lösung aus Glutarsäureanhydrid in DMF für 4h bei RT unter Argon carboxyfunktionalisiert. Die Oberfläche wurde anschließend mehrfach gründlich mit DMF und Wasser gewaschen. Anschließend wurden die freien Carboxylgruppen mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Hierzu wurde die Oberfläche mit einer Lösung aus 1 M DCC und 1 M NHS in DMF benetzt. Nach 4stündiger Reaktionszeit wurden die Träger gründlich mit DMF und Aceton gewaschen.

Die auf diese Weise eingeführte NHS-Ester-aktivierte Carboxygruppe konnte anschließend als Initiatorgruppe eingesetzt werden

7.3 Verknüpfung der Oberfläche mit einem aminoterminierten Dendrimer (Amino-Dendrimer-Immobilisierung)

Die der dendrimeren Grundeinheit mit dem Substrat erfolgte wie in Beispiel 1 unter 1.3 ausgeführt.

7.4 Umsetzen mit Linkersubstanz (Erzeugen von freien Kupplungsgruppen)

Die gemäss 1.3 mit dendrimeren Grundeinheiten ausgerüsteten Glasträger wurden in eine gesättigte Lösung von Glutarsäureanhydrid in DMF überführt. Nach 4stündiger Reaktionszeit wurde gründlich mit DMF und Wasser gewaschen. Anschließend wurden die freien Carboxylgruppen mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Hierzu wurde die Oberfläche mit einer Lösung aus 1 M DCC und 1 M NHS in DMF benetzt. Nach 4stündiger Reaktionszeit wurden die Träger gründlich mit DMF und Aceton gewaschen. Der Glasträger mit Dendrimer-Oberfläche konnte jetzt direkt für eine im folgenden näher beschriebene Immobilisierung bioorganischer Makromoleküle eingesetzt oder alternativ bis zur Verwendung unter Argon aufbewahrt werden.

Zu den vorstehenden Beispielen 1 – 7 gehören die beigelegten Figuren 1 und 2, die nachfolgend noch näher erläutert werden. Es stellen dar:

Figur 1: Oberflächenmodifikation zur Erzeugung Dendrimer- basierender, makromolekularer Sensoroberflächen.

Figur 2: Anknüpfung von Biomolekülen an die Oberflächen gemäss Fig. 1

In Figur 1 ist die Oberflächenmodifikation eines Glasträgers, Kunststoffträgers oder Gold-beschichteten Trägers (als Substrat) dargestellt, vgl. insbesondere die Beispiele 1, 4, 5 und 7.

Schritt 1 zeigt die Aminoaktivierung der Oberfläche durch Silylierung, RFPD oder ω -Aminoalkylthiol-SAM, vgl. Beispiel 1, 1.1.

Schritt 2 führt durch Anbindung einer Dicarbonsäure zu einer carboxylierten Oberfläche, vgl. Beispiel 1, 1.2.

An dieser Oberfläche wird gemäss Schritt 3 ein polyfunktionalisiertes Amino-Dendrimer fixiert. Typischerweise wird hierfür ein Dendrimer der 4. Generation mit 64 Aminogruppen verwendet, vgl. Beispiel 1, 1.3.

Die abschließende Endgruppenaktivierung und das Crosslinking der fixierten Dendrimere kann aus Schritt 4 ersehen werden. Aus Übersichtsgründen nicht dargestellt ist die intramolekular auftretende Vernetzung (Crosslinking) von Aminoendgruppen, vgl. Beispiel 1, 1.4.

In Figur 2 ist eine Dendrimer-basierte, Isothiocyanat-funktionalisierte Oberfläche dargestellt, die mit bioorganischen Makromolekülen beladen ist. Bei den Makromolekülen handelt es sich um amino-funktionalisierte Oligonucleotide. Derartige Oberflächen sind als Sensoroberflächen von besonderem Interesse für die DNA-Chiptechnologie, vgl. Niemeyer, C.M.; Blohm, D. *Angew. Chem.* **111/19** 3039-3043 (1999). Die Anbindung der Oligonucleotide erfolgt wie zu Beispiel 1 unter 1.5 beschrieben; eine Regeneration kann beispielsweise im alkalischen Medium erfolgen (z.B. unter folgenden Bedingungen: Einsatz von 50 mM NaOH, Raumtemperatur, 2 x 3 min).

Beispiel 8:

Vergleichende Betrachtung von Homogenität und Beladungsdichte bei DNA-Arrays die (a) mit konventionellem linearem Linker und (b) durch erfindungsgemäße Oberflächenmodifikation erhalten wurden

Die durchgeführte Untersuchung wird anhand der Fig. 3 (mit Fig. 3-1 und 3-2) näher erläutert.

Fig. 3-1 zeigt einen konventionellen DNA-Array, der 5'-aminomodifizierte Fängeroligonucleotide trägt, die über einen konventionellen linearen Linker oberflächen-fixiert sind.

Die Aktivierung der Oberfläche wurde folgendermaßen durchgeführt:

Nach Silylierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan wie zu Beispiel 1 unter 1.1 beschrieben wurde 1,4-Phenylendiisothiocyanat angebunden. Die einzelnen Spots wurden dabei mit einer piezokeramischen Pipette auf die konventionelle Oberfläche aufgetragen um den Oligonucleotid-Array zu bilden. Die Spots einer senkrechten Reihe wurden jeweils mit dem gleichen Volumen an Fängeroligonucleotidlösung erzeugt: Reihen 1-4, 9-12 = 2 nl; 5-8, 13-16 = 4 nl. Die Konzentration der gespotteten Oligomerlösung betrug 10 µmol/l in Bidest.

Figur 3-2 zeigt zum Vergleich einen erfindungsgemäßen DNA-Array mit einer erfindungsgemäßen (Sensor-)Oberfläche.

Der Modifikationsweg ist in Beispiel 1 beschrieben.

Immobilisiert wurde das gleiche Fängeroligonucleotid wie im Falle des Arrays aus Abb. 3-1.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Arrays wurde das Spotvolumen innerhalb der jeweiligen Reihen 1-16 variiert: obere 7 Spots: 2 nl; untere 8 Spots: 4 nl. Die Konzentration der gespotteten Oligomerlösung betrug 10 µmol/l in Bidest.

Hybridisierung und vergleichende Array-Auswertung:

In beiden Fällen wurde 1h lang bei Raumtemperatur mit einer 1 nM Lösung der 3'-Cy5-markierten, komplementären Nucleinsäure hybridisiert. Die Array-Auswertung erfolgte durch Fluoreszenz-Anregung und Auslesung mit einer handelsüblichen CCD-Kamera.

Der nach einem herkömmlichen Verfahren, nämlich durch Isothiocyanataktivierung amino-silylierter Glasoberflächen hergestellte Array aus Fig. 3-1 zeigt deutliche Inhomogenitäten in der Signalintensität innerhalb der senkrechten Reihen 1 – 16, obwohl aufgrund identischer Bedingungen die gleiche Intensität zu erwarten war. Dieser Effekt ist auf eine inhomogene Oberflächenmodifikation zurückzuführen und lässt sich bei Arrays ohne erfindungsgemäßer Oberflächenmodifikation nur

schwer verhindern. Derartige Effekte würden eine quantitative Auswertung des Arrays stark behindern.

Hingegen weisen die einzelnen Signale des Arrays mit erfindungsgemäßer Oberflächenaktivierung aus Fig. 3-2 innerhalb einer senkrechten Reihe nahezu die gleiche Intensität auf. Die Homogenität der Oberflächenmodifikation ist durch das erfindungsgemäße Verfahren also deutlich verbessert.

Die unterschiedliche Beladungsdichte mit Fängeroligonucleotiden wird aus den verschiedenen Belichtungszeiten während der Aufnahme deutlich. Für die Aufnahme Fig. 3-1 war eine Belichtungszeit von 120 sec notwendig, um Signale detektieren zu können; für Aufnahme Fig. 3-2 lediglich 10 sec.

Beispiel 9:

Vergleichende Betrachtung der Regenerationsstabilität eines DNA-Arrays mit konventionellem linearem Linker und eines durch erfindungsgemäße Oberflächenmodifikation erhaltenen DNA-Arrays

Die durchgeführte Untersuchung wird anhand der Fig. 4 (mit Fig. 4-1 bis 4-8) näher erläutert.

Der in den Fig. 4-1 bis 4-3 dargestellte DNA-Array umfasst einen konventionellen linearen Linker, während der in den Fig. 4-4 bis 4-8 dargestellte Array eine erfindungsgemäße (Sensor-)Oberfläche aufweist. Die Oberflächenmodifikation und Hybridisierung der Arrays erfolgte so wie zu Beispiel 7 beschrieben. Besspottet wurden jeweils Quadrupole mit variierenden Volumina von 1,4 – 5,6 nl. Regeneriert wurde jeweils 2 x 3 min mit 50 mM NaOH bei RT.

Fig. 4-1 zeigt den Array mit linearem Linker nach der ersten Hybridisierung, Fig. 4-2 zeigt den Array nach der Regeneration und Abb. 4-3 zeigt den Array nach der zweiten Hybridisierung. Deutlich ist zu sehen, daß bereits nach dem ersten Regenerationsschritt die Signalintensität stark verringert ist. Ursache ist die

Ablösung des Fängeroligonucleotides während des Regenerationsprozesses aufgrund der inhärenten Instabilität des konventionellen Linkers.

Fig. 4-4 bis 4-8 zeigen die durch das erfindungsgemäße Verfahren verbesserten Regenerationseigenschaften. Auch nach wiederholtem Regenerationsprozess kann vorteilhafterweise keine Abnahme der Signalintensität beobachtet werden.

Weitere Figuren:

Fig. 5 ist eine stark schematische Darstellung der bevorzugten Sandwich-Präparationstechnik, siehe oben.

Fig. 6 ist eine stark schematische Darstellung eines bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung eines Artikels mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung von Makromolekülen oder sonstigen Verbindungen.

Patentansprüche

1. Artikel mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung von Makromolekülen, umfassend

- ein Substrat mit einer Oberfläche,
- ein mit der Substrat-Oberfläche verknüpftes dendrimeres Gerüst und
- eine Anzahl von mit dem dendrimeren Gerüst verknüpften ersten Kupplungsgruppen zur Immobilisierung von Makromolekülen

2. Artikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Artikel

- ein Sensor oder Sensorelement,
- ein Array wie z.B. ein DNA-(Mikro-)Array, ein Protein-(Mikro-)Array,
- ein Peptide, Peptoide oder niedermolekulare Verbindungen wie Pharmakophore tragendes Testarray,
- ein Bestandteil eines (Mikro)Reaktionsgefäßes oder
- ein optisch oder elektronisch-aktives Element ist.

3. Artikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das dendrimere Gerüst eine Anzahl von dendrimeren Grundeinheiten umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die besteht aus: organischen Dendrimeren, Starburst-Dendrimeren, Metallodendrimeren, Halbmetallodendrimeren, Carbosilan-Dendrimeren, Polysilan-Dendrimere, Glycosyl-haltigen Dendrimeren, Saccharid- und Oligosaccharid-Dendrimeren, Peptid- und Oligopeptid-Dendrimeren, Nucleotid- und Oligonucleotid-Dendrimeren sowie Derivaten der vorgenannten Dendrimere.

4. Artikel nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das dendrimere Gerüst dendrimere Grundeinheiten umfasst, die untereinander vernetzt sind.

5. Verfahren zur Herstellung eines Artikels mit aktivierter Oberfläche zur Immobilisierung von Makromolekülen, mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen eines Substrates mit einer Oberfläche
- Verknüpfen der Substrat-Oberfläche mit dendrimeren Grundeinheiten und

- Ausrüsten der dendrimeren Grundeinheiten mit einer Anzahl von ersten Kupplungsgruppen zur Immobilisierung von Makromolekülen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Substrat-Oberfläche zum Verknüpfen mit den dendrimeren Grundeinheiten mit einer Anzahl von Initiatorgruppen ausgerüstet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Initiatorgruppen ausgewählt sind aus der Gruppe, die besteht aus: Hydroxyl-, Amino-, Carboxyl-, Ester-, Acylhalogenid-, Aldehyd-, Epoxy- und Thiolgruppen sowie Disulfide, Metallchelate, Nucleotide- und Oligonucleotide, Peptide und Haptene, wie beispielsweise Biotin-, Digoxigenin-, Dinitrophenylgruppen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-7 wobei, das Substrat ein Trägermaterial umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus: Trägermaterialien auf der Basis von Metallen, Halbmetallen, Halbleitermaterialien, Metall-, Halbmetall- und Nichtmetalloxiden; Gläsern; Kunststoffen; organischen und anorganischen Polymeren; organischen und anorganischen Filmen, Gelen und Monoschichten, insbesondere als Beschichtung eines der vorgenannten Materialien.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-8, wobei die dendrimeren Grundeinheiten ausgewählt sind aus der Gruppe, die besteht aus: Starburst-Dendrimeren, Metallodendrimeren, Glycosyl-haltigen Dendrimeren, Saccharid- und Oligosaccharid-Dendrimeren, Peptid- und Oligopeptid-Dendrimeren, Nucleotid- und Oligonucleotid-Dendrimeren sowie Derivaten der vorgenannten Dendrimere.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-9, wobei die dendrimeren Grundeinheiten mit einer Anzahl von ersten Kupplungsgruppen zur Immobilisierung von Makromolekülen ausgerüstet werden, indem funktionelle Gruppen der dendrimeren Grundeinheiten mit einer bifunktionellen Linkersubstanz umgesetzt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die dendrimere Grundeinheiten vor dem Verknüpfen der Substrat-Oberfläche mit den dendrimere Grundeinheiten mit den ersten Kupplungsgruppen ausgerüstet werden.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die dendrimere Grundeinheiten erst nach dem Verknüpfen der Substrat-Oberfläche mit den dendrimere Grundeinheiten mit den ersten Kupplungsgruppen ausgerüstet werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-12, wobei die dendrimere Grundeinheiten zu einem dendrimere Gerüst vernetzt werden.

14. Verfahren zur Herstellung eines Artikels mit einem auf der Oberfläche immobilisierten Makromolekül mit folgendem Schritt:

- Kontaktierung eines mindestens eine zweite Kupplungsgruppe umfassenden Makromoleküls

(a) mit einem Artikel gemäß einem der Ansprüche 1-4

oder

(b) mit einem gemäß einem der Ansprüche 5-13 hergestellten Artikel mit aktivierter Oberfläche

unter Bedingungen, bei denen zumindest eine erste Kupplungsgruppe des Artikels und eine zweite Kupplungsgruppe des Makromoleküls unter Ausbildung einer Verknüpfung zwischen Makromolekül und Artikel miteinander reagieren.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-14, wobei das Makromolekül bzw. die Makromoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe, die besteht aus: bioorganischen Makromolekülen wie Nucleinsäuren, Antikörpern, Enzymen, Rezeptoren, Membranproteinen, Glykoproteinen, Kohlenhydraten; makromolekularen und kolloidalen Nanopartikeln; niedermolekularen Verbindungen wie pharmakologisch aktiven Substanzen, Hormonen, Antigenen.

16. Artikel,

dadurch gekennzeichnet, dass er gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6-15 erhältlich ist.

Fig. 1

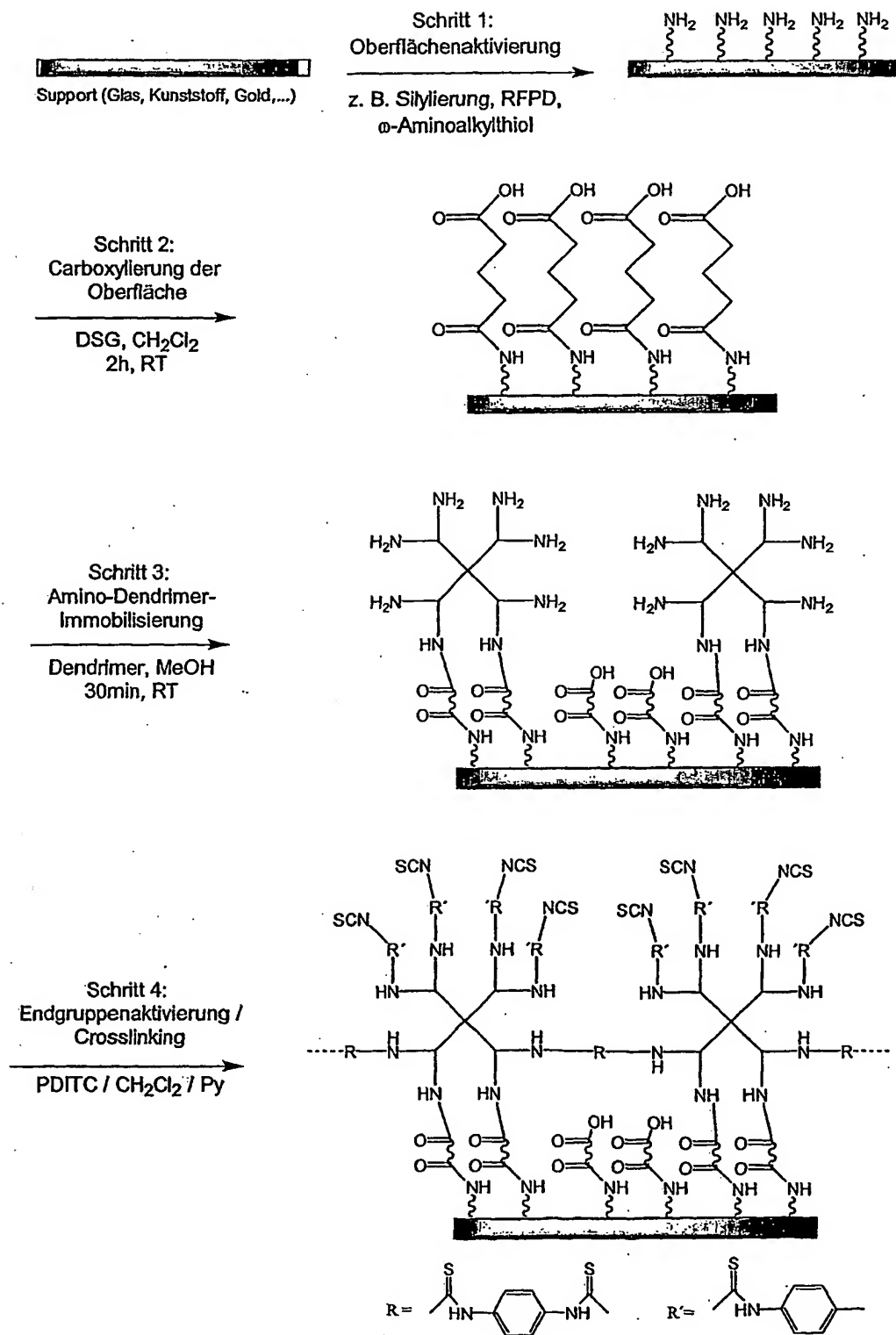


Fig. 2

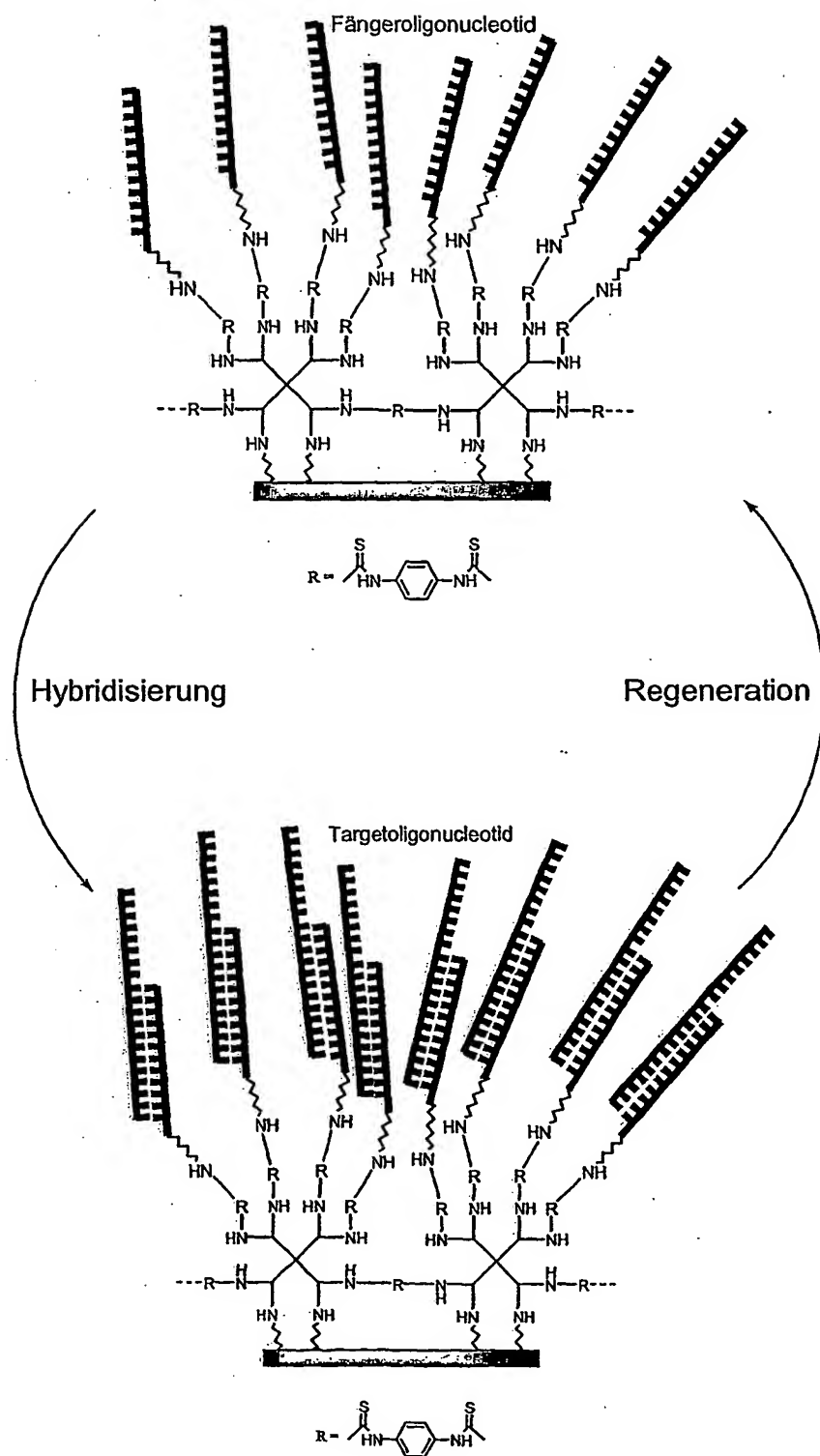


Fig. 3

Reihe:

1

16

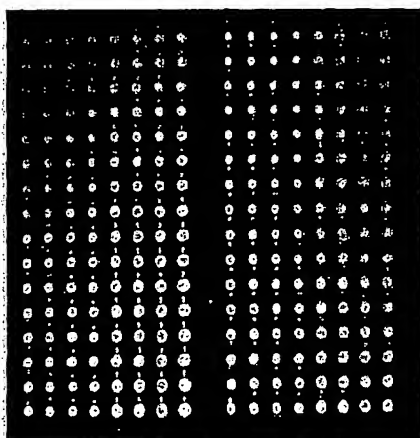


Fig. 3-1

Reihe:

1

16

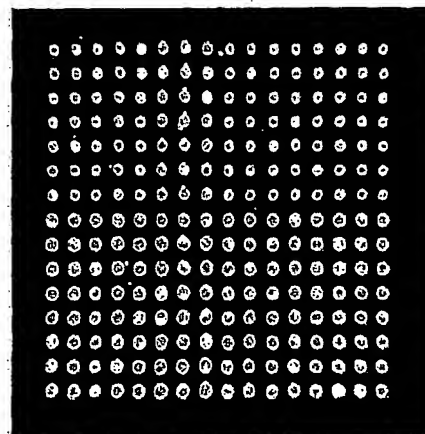
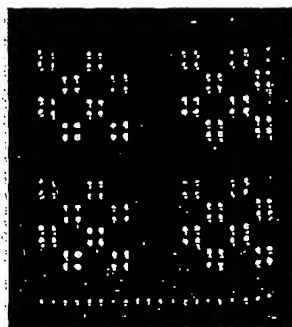


Fig. 3-2

Fig. 4-1 - 4-8

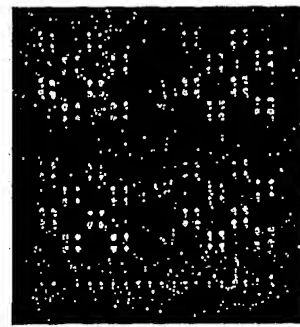
Regenerationsstabilität der erfindungsgemäßen Sensoroberflächen



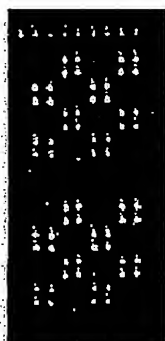
1



2



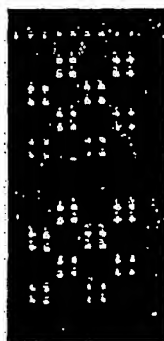
3



4



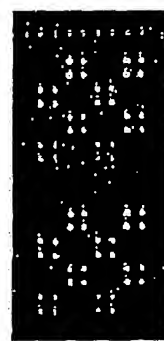
5



6



7



8

Fig. 5

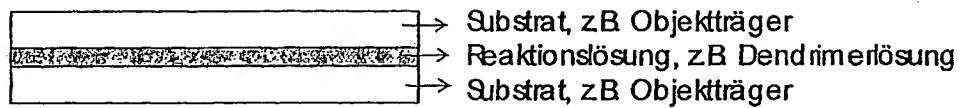
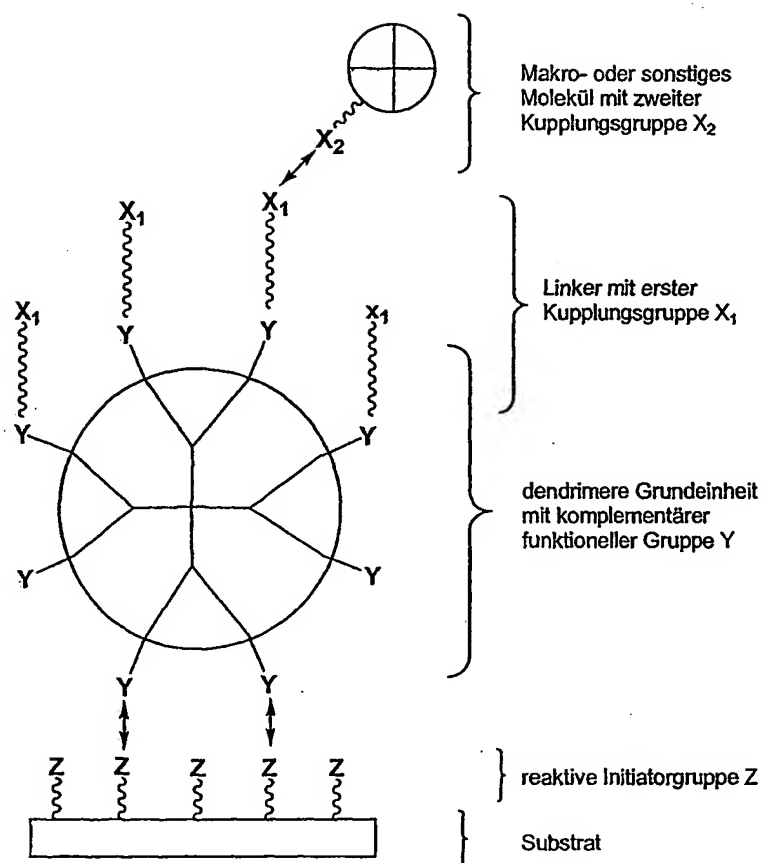


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C335/20 C07H21/00 C12Q1/68 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C C07H C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BEIER M ET AL: "Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 27, no. 9, 1999, pages 1970-1977, XP002145887 ISSN: 0305-1048 cited in the application page 1971, right-hand column, paragraph 3 figures 1,3,5 -/--	1-4, 14-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 August 2001

Date of mailing of the international search report

24/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Held, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03295

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZENG ET AL: "Dendrimers in supramolecular chemistry" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, US, vol. 97, no. 5, 1997, pages 1681-1712, XP002082739 ISSN: 0009-2665	1-16
Y	cited in the application page 1692, left-hand column, last paragraph -page 1695, right-hand column, paragraph 3 page 1707, right-hand column -page 1708, right-hand column figures 39,40	1-16
X	WO 00 02656 A (ALPER HOWARD ;ARYA PRABHAT (CA); JEFFERSON GARY (CA); BOURQUE SHEI) 20 January 2000 (2000-01-20) claim 1 example 1	1-3,16
Y	WO 95 20320 A (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY (US)) 3 August 1995 (1995-08-03) example 2 figure 2	1-16
A	WO 98 18488 A (POLYPROBE INC) 7 May 1998 (1998-05-07) claim 1	1,5,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/03295

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0002656	A	20-01-2000	EP 1102634 A	30-05-2001
WO 9520320	A	03-08-1995	US 5561043 A	01-10-1996
			AU 1730595 A	15-08-1995
			EP 0744894 A	04-12-1996
			JP 9511641 T	25-11-1997
			US 5965133 A	12-10-1999
WO 9818488	A	07-05-1998	US 6117631 A	12-09-2000
			AU 718804 B	20-04-2000
			AU 4914097 A	22-05-1998
			EP 0951297 A	27-10-1999
			JP 2001503517 T	13-03-2001
			US 6110687 A	29-08-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03295

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07C335/20 C07H21/00 C12Q1/68 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07C C07H C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BEIER M ET AL: "Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 27, Nr. 9, 1999, Seiten 1970-1977, XP002145887 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt Seite 1971, rechte Spalte, Absatz 3 Abbildungen 1,3,5 — -/-	1-4, 14-16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. August 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/08/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2⁺
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beidensteter

... Held, -P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ZENG ET AL: "Dendrimers in supramolecular chemistry" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, US, Bd. 97, Nr. 5, 1997, Seiten 1681-1712, XP002082739 ISSN: 0009-2665 in der Anmeldung erwähnt	1-16
Y	Seite 1692, linke Spalte, letzter Absatz -Seite 1695, rechte Spalte, Absatz 3 Seite 1707, rechte Spalte -Seite 1708, rechte Spalte Abbildungen 39,40	1-16
X	WO 00 02656 A (ALPER HOWARD ;ARYA PRABHAT (CA); JEFFERSON GARY (CA); BOURQUE SHEI) 20. Januar 2000 (2000-01-20) Anspruch 1 Beispiel 1	1-3,16
Y	WO 95 20320 A (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY (US)) 3. August 1995 (1995-08-03) Beispiel 2 Abbildung 2	1-16
A	WO 98 18488 A (POLYPROBE INC) 7. Mai 1998 (1998-05-07) Anspruch 1	1,5,14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03295

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0002656	A	20-01-2000	EP	1102634 A	30-05-2001
WO 9520320	A	03-08-1995	US	5561043 A	01-10-1996
			AU	1730595 A	15-08-1995
			EP	0744894 A	04-12-1996
			JP	9511641 T	25-11-1997
			US	5965133 A	12-10-1999
WO 9818488	A	07-05-1998	US	6117631 A	12-09-2000
			AU	718804 B	20-04-2000
			AU	4914097 A	22-05-1998
			EP	0951297 A	27-10-1999
			JP	2001503517 T	13-03-2001
			US	6110687 A	29-08-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.